

Published on December 13, 1994

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-340701

(43)公開日 平成6年(1994)12月13日

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>  
 C 08 B 37/00  
 A 23 L 1/30  
     1/308  
 A 61 K 31/715      ABD  
                    ADU      9454-4C

審査請求 未請求 請求項の数 5 FD (全 12 頁) 最終頁に統ぐ

(21)出願番号	特願平5-154139	(71)出願人	000004444 日本石油株式会社 東京都港区西新橋1丁目3番12号
(22)出願日	平成5年(1993)6月1日	(72)発明者	渡邊 君子 神奈川県横浜市中区千鳥町8番地 日本石油株式会社中央技術研究所内
		(72)発明者	内山 洋子 神奈川県横浜市中区千鳥町8番地 日本石油株式会社中央技術研究所内
		(72)発明者	清田 隆 神奈川県横浜市中区千鳥町8番地 日本石油株式会社中央技術研究所内
		(74)代理人	弁理士 藤野 清也

最終頁に統ぐ

(54)【発明の名称】高分岐度β-グルカン、その製造法及び用途

## (57)【要約】

【構成】オウレオバシディウム ブルランス (*Aureobasidium pullulans*) IFO4466菌株の培養上清から得られる、 $\beta$ -1,3結合グルコース残基を主鎖として、これに $\beta$ -1,6結合グルコース残基の分岐鎖を多数側鎖として有する数分子量1万~500万の高分岐度β-グルカン、その製造法及び用途。

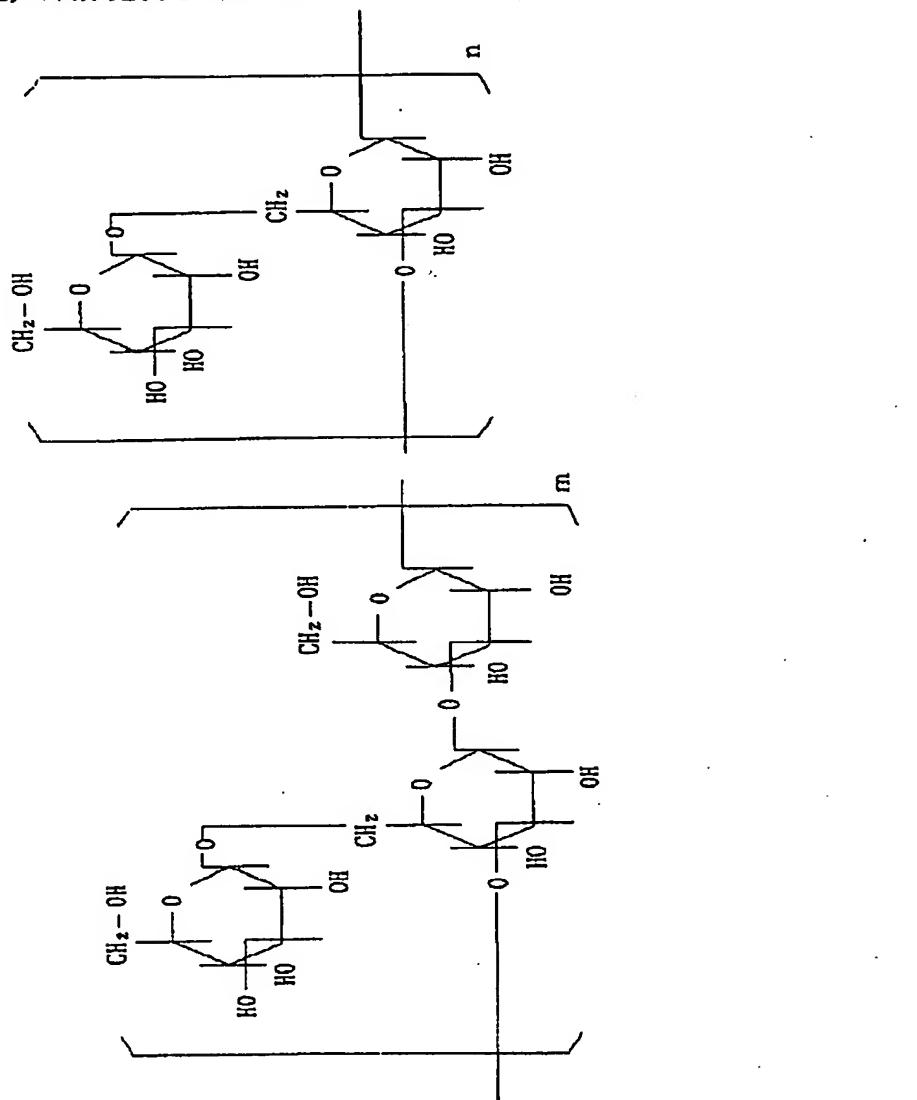
【効果】経口的に高い抗腫瘍活性及び免疫賦活活性を有し、医薬、食品添加物、飼料添加物等として有用である。

1

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の構造式で示され、数平均分子量1万  
～500万（ゲル濾過法で測定）の高分岐度をもつ $\beta$ -グルカン。  
【化1】



（ただし、式中mは80～30%、nは20～70%を示す）

【請求項2】 オウレオバシデュム ブルランス (*Aureobasidium pulluans*) IFO 4466 株の培養上清に有機溶媒を添加して沈澱を生じさせることによって得ることができ、次の理化学的特性を有する高分岐度 $\beta$ -グルカン。

- 1) 数平均分子量1万～500万（ゲル濾過法による測定）。
- 2) 赤外吸収スペクトル（KBr法）で波長  $880\text{cm}^{-1}$  に $\beta$ -グルコシド結合配向に特徴的な吸収がある。
- 3)  $^{13}\text{C}$  NMRスペクトルで
  - i)  $\delta$  値  $68\text{ppm}$ ,  $86\text{ppm}$ ,  $103\text{ppm}$ 付近にシグナルを有する。

ii)  $\delta$  値  $61\text{ppm}$  のシグナルの強度が  $60.5\sim60.8\text{ppm}$  のそれの  $1.2\sim3.0$  倍である。

iii)  $\delta$  値  $85.7\text{ppm}$  のシグナルの強度が  $86.2\text{ppm}$  のそれの  $1.2\sim3.0$  倍である。

【請求項3】 キシロースおよびビタミンCを必須成分として含む液体培地に、オウレオバシデュム ブルランス (*Aureobasidium pulluans*) IFO 4466株を接種して培養し、得られる培養上清から高分岐度 $\beta$ -グルカンを採取することを特徴とする請求項1記載の高分岐度 $\beta$ -グルカンの製造法。

【請求項4】 請求項1または2記載の高分岐度 $\beta$ -グルカンを有効成分とする感染症予防剤。

【請求項5】 請求項1または2記載の高分岐度 $\beta$ -グルカンを有効成分とする抗腫瘍剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、高分岐度 $\beta$ -グルカン、その製造法及び感染症予防剤あるいは抗腫瘍剤に関する。本発明の感染症予防剤あるいは抗腫瘍剤は、医薬あるいは食品添加剤、飼料添加剤などとして有用である。

【0002】

【従来の技術】 従来、オウレオバシディウム属(*Aureobasidium* sp.)が $\beta$ -1, 3-1, 6-D-グルカンを生成することは知られていた (*Acta Chemica Scandinavica* 17, 1351-1356(1963)、*Agric. Biol. Chem.* 47 (6), 1167-1172(1983))。これらのグルカンはリン酸基、リノ酸基またはスルホン酸基が付いており、活性を高めるためにはこれらの官能基を取り除かなければならぬという問題があった。一方、多数分岐を有するのグルカンも知られているが (*Chem. Pharm. Bull.*, 40, 2215(1992))、分岐のない主鎖のグルコース単独同志の結合が多数存在しているものであり、またこのグルカンは抗腫瘍活性を有していないものであった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明者らは、このようなオウレオバシディウム属の產生する高分子多糖に注目し、新規で、かつさらに生理活性の高い $\beta$ -グルカンを得ようとして検討を重ねたところ、オウレオバシディウム ブルランス IFO 4466 株が高分岐度の $\beta$ -グルコシド結合をもつ新規グルカンを产生し、このグルカンがリン酸基等と結合しないグルコースのみからなる多糖で経口的に高い抗腫瘍活性及び免疫賦活作用を示すとを見出でて本発明を完成するに至った。

【0004】 従って、本発明の課題は、新規な高分岐度の $\beta$ -グルコシド結合をもつグルカンを提供することにある。また、本発明の課題は、オウレオバシディウム ブルランス IFO 4466 株を用いる新規な高分岐度 $\beta$ -グルカンの製造法を提供することにある。さらに本発明の課題は、このような新規な高分岐度 $\beta$ -グルカンを有効成分とする抗腫瘍剤及び感染症予防剤を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】 すなわち、本発明者らは、前記したようにオウレオバシディウム属の產生する多糖について注目し、オウレオバシディウム属に属する種々の微生物を用いて多糖の產生について検討を重ねたところ、オウレオバシディウム ブルランス IFO 4466 株がキシロースおよびビタミンCを必須成分として含有する液体培地において高い收率で生理活性が高く、高分岐度の $\beta$ -グルコシド結合をもつ $\beta$ -グルカンを產生することを見出した。

【0006】 本発明をさらに具体的に説明する。オウレオバシディウム属には、森永力著「講座／真菌の分類・同定②」 (*J. Antibact. Antifung. Agents.* 18 (6) 295-297(1990)によれば、14種1変種があり、そのほとんどがオウレオバシディウム ブルランス (*Aureobasidium pullulans*)である。オウレオバシディウム ブルランスには2つの変種がある。これらの形態的特徴は、コロニーは滑面でしばしば粘性のある分生子の塊りで被われ、通常、気中菌糸はまばらに存在する。コロニーの色は明るい褐色、黄色、ピンクあるいは黒色とさまざまである。菌糸は透明、しばしば褐色になり厚壁である。分生子形成細胞は透明で、菌糸上に分岐して先端にあるいは中間部にそれぞれ形成される。分生子は同調的に出芽法により、分生子形成細胞上から密に作られる。色は透明・滑面壁で单細胞、形や大きさはさまざまである。これらのオウレオバシディウム ブルランスのなかで天然から分離して純化、継代培養してその形質を保持しているものあるいは寄託機関に寄託されている菌株のうち、本発明の高分岐度 $\beta$ -グルカンを产生することができるものであれば、どのような菌株でも用いられる。しかし、財団法人 発酵研究所に寄託されているオウレオバシディウム ブルランス IFO 4466 を使用することが高分岐度 $\beta$ -グルカンの收率及び単離しやすさの点で好ましい。

【0007】 本発明で使用する培地は、炭素源、窒素源、リン、カリウム、マグネシウム等の通常微生物の培養に必要な栄養成分を含む液体培地が用いられる。炭素源としては少なくともキシロースおよびビタミンCを必須成分として用いる。炭素源として、これ以外に例えばグルコースやシュークロースを用いることができる。使用割合は炭素源としてキシロース 5~150g/L、好ましくは10~100g/L、最も好ましくは20~60g/L、ビタミンC 0.01~100g/L、好ましくは 0.1~60g/L、最も好ましくは 0.5~20g/L が用いられる。炭素源以外の成分の使用割合は  $\text{NaNO}_3$  0.5g/L~20g/L、好ましくは 1~10g/L、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.05~10g/L、好ましくは 0.1~5g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0~20g/L、好ましくは 0.5~5g/L、 $\text{KCl}$  0.1~10g/L、0.2~5g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05~5.0g/L、好ましくは 0.1~2.0g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0~5g/L、好ましくは 0.005~2.0g/L が用いられる。また本発明の液体培地にビタミンB<sub>1</sub>を添加することもできる。培養は、通常、温度 5~40°Cで1~10日間培養する。好ましくは通気下で行う。こうして培養液中に本発明の高分岐度 $\beta$ -グルカンが产生される。

【0008】 培養終了後、培養液に遠心分離等の手段を施して培養液から菌体を除去し、培養上清から本発明の高分岐度 $\beta$ -グルカンを採取する。採取方法としては培養上清に有機溶媒を加えて本発明の高分岐度 $\beta$ -グルカンを沈殿させる方法を好ましく用いることができる。有機溶媒として特に制限はないが、例えばアルコール、ケ

トン、ニトリル等が用いられる。具体的にはエタノール、イソプロピルアルコール、アセトンやアセトニトリルなどが挙げられるが、特にエタノールが好ましい。得られる生成物は、本発明の高分岐度 $\beta$ -グルカンのほかに、通常、低分子化合物、タンパク、水不溶性のグルカン等の不純物を含有している。本発明において本発明の高分岐度 $\beta$ -グルカンを食品添加剤あるいは飼料添加剤として用いるときは、前記生成物をそのままあるいは乾燥して用いることができる。

【0009】しかし、医薬品等の有効成分として用いる場合は、セルロースチューブなどを用いて透析を行って低分子化合物を除去し、また、トリクロロ酢酸、ビクリン酸などの酸性物質あるいは、n-ブタノール、n-ブタノールのクロロホルム溶液等の有機溶剤を除タンパク剤として用いてタンパクを沈澱除去する。さらに、高分岐度 $\beta$ -グルカンの沈澱に、0.5N程度のアルカリ水溶液を加えてこの沈澱を溶解し、不溶性のグルカンを沈澱除去し、水可溶性のグルカンだけを酢酸、クエン酸、塩酸、硫酸などの酸で中和して精製された高分岐度グルカンを得る。不純物除去操作で使用した薬品は、透析、ゲル透過、限外濾過などによって除去して純度が高い本発明の高分岐度 $\beta$ -グルカンを得ることができる。

【0010】このようにして得られた高分岐度 $\beta$ -グルカンの理化学的性質を示すと次のとおりである。

#### 【0011】(1) 構成単糖

前記高分岐度 $\beta$ -グルカン50mgに1N硫酸2mlを加えて8時間加熱して加水分解を行い、その後常法に従って水素化ホウ素ナトリウムにより還元した上、ビリジンと無水酢酸とによりアセチル化し、ガスクロマトグラフィー(カラム：3重量%ECNSS-M/クロモソルブW温度：190°C キャリアガス：窒素ガス、キャリアガス流量：3ml/分)により分析したところ、比旋光度 $[\alpha]$ <sub>D</sub><sup>25</sup>は+50°であり、D-グルコース〔文献値 $[\alpha]$ <sub>D</sub><sup>25</sup>+52.8°(広川書店発行「有機定性分析」第276頁)〕のそれとほぼ一致することから99%以上がグルコースであることが認められた。さらに、また本発明の高分岐度 $\beta$ -グ

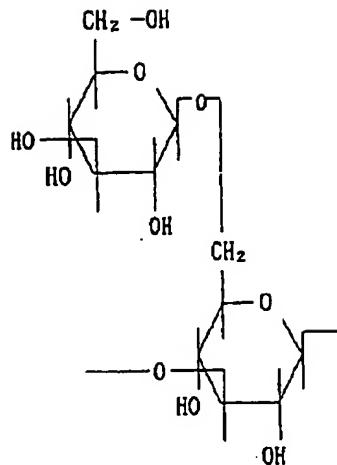
ルカンを、市販のキラターゼを精製して得られたエキソ $\beta$ -グルカナーゼにより酵素分解を行い、分解糖を薄層クロマトグラフィー(TLC)で調べた。この精製酵素はグルコースの $\beta$ -1,3結合のみからなるラミナリンに作用させ、TLCで分解糖を調べるとグルコースのみが検出されるが、本発明の高分岐度 $\beta$ -グルカンから得られた分解糖はグルコースおよびゲンチオビースと同じRf値を持っていた。しかもグルコース1に対し、ゲンチオビースが2以上であった。また酵素による分解速度はラミナリンの分解速度の1/20であったことから主鎖の $\beta$ -1,3結合の切断は分岐鎖により立体障害を受けたことが判明した。このようにして得られた酵素分解物と、前記酸分解物とをHPLC分析(カラム： $\mu$ BondaSphere-NH<sub>2</sub> 5μ 100Å、溶媒：80%CH<sub>3</sub>CN、流速：0.8ml/ml、検出：示差屈折計による)によって分解糖を定量したところ酵素による分解率は酸による分解率の1%以下であって、酵素により非常に分解されにくいことを示した。

【0012】(2) グルコースの結合様式及び分岐度  
本発明の高分岐度 $\beta$ -グルカンを100°Cでジメチルスルホキシド(DM50)-d<sub>6</sub>に溶解し、100°Cに保持したまま測定した<sup>13</sup>C NMRスペクトルの1例を図1に示す。図1に示すように(i)δ値 68ppm域に、化3に示されるグルコース残基A中のC-6の炭素に帰属するピークS<sub>1</sub>、(ii)δ値 86ppm域に化3に示される前記グルコース残基A及びグルコース残基C中のC-3の炭素に帰属するピークS<sub>2</sub>、及び(iii)δ値 103ppm域に化3に示されるグルコース残基A、B及びC中のC-1の炭素に帰属するピークS<sub>3</sub>の3個のシグナルが認められる。このことから、本発明の高分岐度 $\beta$ -グルカンは、 $\beta$ 1→3結合を介して結合した前記AあるいはCからなる主鎖に $\beta$ 1→6結合を介して結合した前記Bが分岐しているものと判断される(Carbohydrate Polymers\_2, 135-144(1982)参照)。

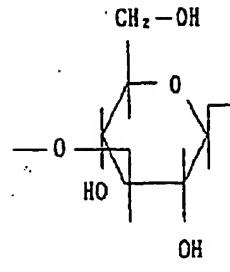
【0013】

【化2】

B



A



C

【0014】また、図1を拡大すると、図2にみられるようにδ値60.5~60.8ppm域にグルコース残基C中のC-6の炭素に帰属するシグナルS<sub>c</sub>の強度が1に対し、δ値61.0ppm域のグルコース残基BのC-6の炭素に帰属するシグナルS<sub>b</sub>の強度が約2であるから本発明の高分岐度β-グルカン中には主鎖のグルコース残基3個に対して分岐したグルコース残基が2個存在する。

【0015】さらに、β(1→3)結合のC-3炭素に帰属するシグナルが検出される領域の拡大スペクトルを図3に示す。図3においてδ値85.7ppmのシグナルS<sub>a</sub>は、HSQC-TOCSY〔吉岡書房発行「エルンスト二次元NMR」第589頁(1991年)及び丸善発行、日本化学会編「実験化学講座」第5巻第133~137頁(1991年)〕で、グルコース残基AのH-6水素のシグナル(δ値3.58および4.08ppm)との相関が観測されることから、グルコース残基AのC-3炭素に帰属される(Carbohydrate Polymers 2, 135~144(1982)参照)。残りのδ値86.2ppmのシグナルS<sub>d</sub>はグルコース残基CのC-3炭素に帰属される。さらに本発明の高分岐度β-グルカンは、スクレログルカンやラミナリンのようなグルコース残基Cが連続するユニットを部分構造として持つ

30

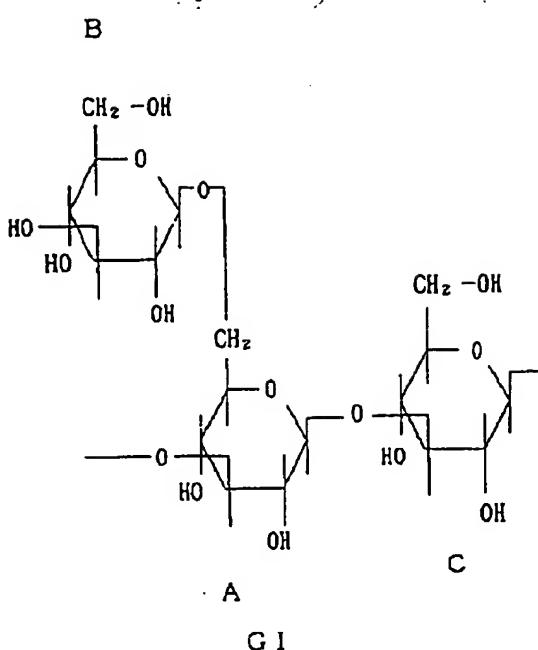
40

グルカンで観測されるはずのδ値85.9ppmのC-3炭素に相当するシグナルが検出されないことから、本発明の高分岐度グルカン中のグルコース残基CはそのC-3炭素側に必ずグルコース残基Aが結合するものである。S<sub>c</sub>とS<sub>b</sub>のシグナル強度比が2:1であることから、この例による本発明の高分岐度β-グルカンは化4に示す構造のユニットGIおよびGIIで構成され、GIとGIIの存在比は1:1であることがわかる。例えばDMSOを用いて室温で分別処理すると本発明の高分岐度β-グルカンにはDMSOに溶解する成分と不溶の成分があり、図4に示すスペクトル中のシグナルS<sub>a</sub>とS<sub>d</sub>の面積強度比からDMSOに溶解する成分は主鎖のグルコース残基が9個に対して分岐したグルコース残基が5個から成るβ-グルカンであり、DMSOに不溶な成分は主鎖のグルコース残基が4個に対して分岐したグルコース残基が3個から成るβ-グルカンである。すなわち、本発明の高分岐度β-グルカンはGIIユニットを20~70%含有する。

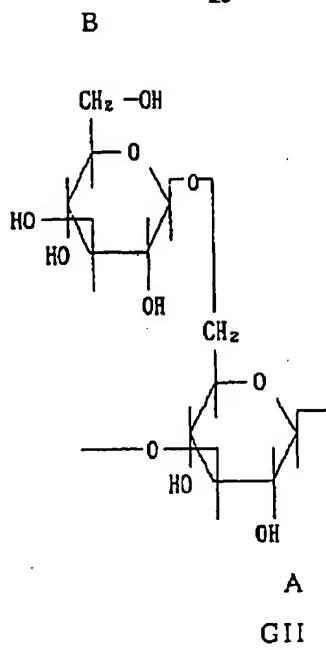
【0016】

【化3】

9



10



【0017】(3) 赤外吸収スペクトル(KBr法)

図5に示すように波長 880cm<sup>-1</sup>にβ-グルコシド結合配向に特徴的な吸収(P)がある。

【0018】(4) 分子量(ゲル濾過法)

数平均 1万~500万、好ましくは50万~500万

【0019】(5) 星色反応: モーリッシュ反応、ア

ンスロン硫酸反応、フェノール硫酸反応: 陽性

ニンヒドリン反応、ピューレット反応: 陰性。

【0020】以上より理化学的性質から本発明の高分岐度β-グルカンの化学構造は次の通りと決定された。

【0021】

【化4】